

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 726 472**

⑫ N° d'enregistrement national :

**94 13306**

⑬ Int Cl<sup>6</sup> : A 61 K 39/39, C 12 N 15/31, 15/62(C 12 N 15/31,  
C 12 R 1:22)

⑭

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

⑮ Date de dépôt : 07.11.94.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT —  
FR.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.05.96 Bulletin 96/19.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑳ Inventeur(s) : BINZ HANS, BAUSSANT THIERRY,  
HAEUW JEAN FRANCOIS et NGUYEN THIEN  
NGOC.

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : REGIMBEAU.

㉔ **PROTEÏNE PORTEUSE A EFFET ADJUVANT, COMPLEXE IMMUNOGENE LA CONTENANT, LEUR PROCEDE  
DE PREPARATION, SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE ET VACCIN.**

㉕ L'invention concerne un produit adjuvant destiné à  
améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à  
un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une  
partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une  
protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la  
protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*.

L'invention a également pour objet les séquences nu-  
cléotidiques codant pour ces peptides ou protéines et l'utili-  
sation de ces séquences à titre de médicament. Plus parti-  
culièrement, de telles séquences d'ADN peuvent être  
utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation  
par voie intramusculaire ou intradermale.

FR 2 726 472 - A1



La présente invention concerne des adjuvants destinés à être associés à une molécule pour améliorer son activité, en particulier pour augmenter l'intensité de la réponse immunitaire. Elle concerne également des complexes contenant un tel adjuvant associé à une molécule active.

5 La molécule active peut notamment être une protéine, un peptide, un polysaccharide, un oligosaccharide ou un acide nucléique, ADN ou ARN.

La mise au point de vaccins parfaitement définis et dépourvus d'effets secondaires marqués, nécessite l'emploi d'antigènes vaccinaux de faible masse moléculaire, tels que des peptides ou des oligosaccharides. Ces  
10 antigènes de faible masse, mais aussi certains antigènes de masse moléculaire supérieure tels que les polysaccharides de la paroi bactérienne, ne peuvent induire seuls une réponse immunitaire durable et intense. Il est indispensable de lier ces antigènes, par voie chimique ou par génie génétique, à des protéines porteuses.

15 Les protéines porteuses, actuellement utilisées, sont de deux types :  
- les anatoxines tétanique et diphtérique : l'emploi trop fréquent de ces protéines porteuses risque d'aller à l'encontre d'une réponse intense contre l'haptène et risque de poser des problèmes d'immunotoxicologie,  
- un extrait de protéine membranaire de *Neisseria meningitidis* (OMPC) :  
20 est constitué par une protéine membranaire contaminée par des lipides et des LPS.

Le brevet EP- 267 204 a proposé l'utilisation d'une molécule de support destinée à être couplée à un immunogène, et consistant en une protéine de membrane d'*E. coli* ou de *Salmonella*.

25 La Demanderesse a démontré qu'une protéine extraite de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* permet d'améliorer considérablement la réponse immunitaire à un antigène ou un haptène lorsqu'elle est administrée en même temps que celui-ci à un hôte. Plus particulièrement, une protéine OmpA, la protéine P40 de *K. pneumoniae*,  
30 peut être utilisée comme adjuvant dans des complexes immunogènes, où elle est associée à un élément immunogène.

Les conjugués chimiques issus d'un couplage de peptides à la P40 donnent de bons résultats, et une évaluation de la réponse immunitaire montre des réponses en anticorps contre ces peptides supérieures à celles observées en utilisant les protéines porteuses de référence, KLH ou TT.

5        Toutefois, les antigènes peptidiques sont greffés de manière préférentielle sur la partie C-terminale de la séquence, partie de la molécule la plus immunogène, (Puohiniemi, R et al., 1990, Infect Immu. 58, 1691-1696. Ceci peut poser un problème sérieux pour les protéines de fusion contenant la séquence complète de P40. Ainsi, l'utilisation d'un  
10 fragment de la séquence supportant l'activité adjuvante, minimiserait davantage l'immunogénicité de la protéine porteuse et les risques liés à cette immunogénicité.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un  
15 adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et en ce que l'adjuvant comprend au moins une partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine P40.

20        En particulier, l'invention a pour objet un adjuvant constitué d'une protéine ou d'un peptide présentant la séquence de P40 substantiellement dépourvue des parties immunogènes.

Ces fragments de P40 selon l'invention sont notamment :

- 25        - la séquence de P40 dépourvue de la partie C terminale pérисplasmatiche immunogène,
- une séquence contenant la 3ème et la 4ème boucle extramembranaire flanquant une séquence intramembranaire,
- une séquence contenant une boucle extramembranaire invariable et la séquence intramembranaire adjacente.

30        C'est pourquoi, l'un des objets de l'invention est un produit adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

35

Un autre objet de l'invention est un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Les séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 et ID n° 8 correspondent à des adjuvants selon l'invention. Cette protéine et ces peptides adjuvants peuvent notamment être préparés à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*. Le procédé comprend alors les étapes suivantes :

- a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,
- b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,
- c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine ou de peptide, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

Des étapes de dialyse peuvent avantageusement intervenir entre, respectivement, les étapes b) et c) et les étapes c) et d).

L'invention a également pour objet les complexes immunogènes pouvant être obtenus à partir des différents adjuvants.

L'adjuvant peut être associé à l'élément immunogène par couplage chimique.

Ce couplage covalent de l'haptène peptidique à l'adjuvant peut être effectué d'une façon bien connue dans la technique. Des réactifs appropriés à cette fin comprennent notamment les esters de N-succinimide, les carbodiimides, l'EEDQ (N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine) et similaires.

On peut également fusionner par génie génétique le fragment de la protéine P40 en cause et l'élément immunogène.

La protéine de fusion obtenue entre le fragment de la protéine 40 et l'élément immunogène peut également être fusionnée, par génie  
5 génétique à une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

L'élément immunogène, un antigène ou haptène, peut notamment provenir de virus ; on peut citer les protéines du RSV (Virus Respiratoire Syncytial) ou leurs fragments, par exemple la protéine G du RSV, ou  
10 l'antigène de l'hépatite B.

Dans le cas de la protéine G du RSV, on peut utiliser la protéine totale ou ses fragments, éventuellement modifiés par mutagenèse ponctuelle ou délétion.

La Demanderesse a montré que l'administration d'un haptène  
15 couplé à un fragment de la protéine P40 selon l'invention entraînait une augmentation substantielle de la réponse immunitaire, en limitant les risques de réactions à l'encontre de l'adjuvant lui-même.

Un procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à  
20 un adjuvant qui comprend tout ou partie de la séquence de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, sous forme d'un complexe tel que défini précédemment fait également partie de l'invention.

L'invention a donc également pour objet un vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un élément immunogène associé à un fragment de la  
25 protéine P40 dépourvu d'une partie substantielle de la séquence C-terminale de la protéine P40 native.

Elle comprend également des compositions pharmaceutiques contenant un complexe formé entre un adjuvant et un élément immunogène, tel que défini précédemment et des excipients  
30 pharmaceutiquement acceptables adaptés à son administration par voie parentérale et/ou orale.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour les peptides ou les protéines décrits précédemment, et l'utilisation de ces séquences à titre de médicament. Plus particulièrement,  
35 de telles séquences d'ADN peuvent être utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation par voie intramusculaire ou intradermale.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

- 5        **Figure 1 :** Stratégie de clonage par amplification génique de P40.  
      **Figure 2 :** Clonage de P40 dans pVABBG2ΔC.  
      **Figure 3 :** Choix des différents fragments de P40.  
      **Figure 4 :** Clonage de ΔP40G2ΔC dans pVABB  
10        **Figure 5 :** Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC après des  
          immunisations avec différentes concentrations de  
          P40ext-G1ΔC.  
      **Figure 6 :** Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC obtenue avec  
          différents schémas d'immunisation.

15    **Exemple 1 : Isolement et purification de la protéine p40**

**Matériel et méthodes**

20        La biomasse de *Klebsiella pneumoniae* (souche I-145, 40 g de cellules sèches) est ajustée à pH 2,5 à l'aide d'acide acétique pur.

      Après addition de 1/2 volume d'une solution contenant 6% cétrimide, 60% éthanol, 1,5 M  $\text{CaCl}_2$  dont le pH est ajusté à 2,5 avec de l'acide acétique, le mélange est placé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante.

25        Après centrifugation 20 mn à 15000 g à 4° C, les protéines du surnageant sont précipitées à l'éthanol. Deux précipitations successives avec centrifugation intermédiaire (10 mn, 10000 g, 4° C) sont réalisées : de 20 à 50 % puis de 50 à 80%.

30        Les culôts obtenus après la seconde précipitation sont remis en suspension dans une solution de zwittergent 3-14, 1%.

      Après agitation 4 heures à température ambiante, le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH 1N.

Une centrifugation du mélange pendant 20 mn à 10000 g à 4° C permet d'obtenir une fraction enrichie en protéines membranaires (fraction MP).

5 Les protéines de la fraction MP sont dialysées contre un tampon Tris/HCl 20 mM pH 8,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (colonne de Ø = 50 mm x H = 250 mm, gel Biorad Macroprep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus. La protéine P40 est éluée pour une concentration de 50 mM en NaCl dans le tampon d'équilibration.

10 Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (dimensions de la colonne : Ø = 25 mm x H = 160 mm, gel Biorad Macroprep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0,  
15 zwittergent 3-14, 0,1 %. La protéine P40 est éluée pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa.

20

## Résultats

Les fractions obtenues après chaque étape chromatographique sont analysées par SDS-PAGE afin de rassembler celles contenant la protéine  
25 P40.

Les quantités de protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (tableau 1).

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des quantités de protéine et LPS des fractions obtenues pour les différentes étapes du procédé de purification de la protéine P40 (n.d. = non déterminé)

		Protéines	Rendement	LPS
10	Biomasse	40 g	-	n.d.
	Fraction MP	900 mg	2,25 %	n.d.
15	Fraction enrichie en P40	400 mg	1 %	10 %
	Protéine P40	130 mg	0,3 %	<1%

20 La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS-PAGE.

Après l'étape de chromatographie d'échange de cations, la protéine P40 est dépourvue du contaminant majeur présent dans la fraction MP (la protéine présentant une masse moléculaire apparente de 18 kDa) et présente un degré de pureté supérieur à 95%. D'autre part, cette étape de purification permet l'élimination des lipopolysaccharides. Cette étape de purification n'existait pas dans le procédé de purification précédemment présenté.

30 Le profil électrophorétique de la P40 révèle plusieurs bandes. Ces bandes sont reconnues après immunoblot par des anticorps monoclonaux anti-P40 obtenus chez la souris. La bande majeure supérieure correspond à la protéine dénaturée (par le traitement à 100 ° C, 15 min. en présence de SDS), et la bande mineure inférieure à la protéine sous sa forme native.



La P40 est en effet une protéine dite modifiable par la chaleur (heat-modifiable), et cette propriété a été vérifiée à l'aide d'une cinétique de chauffage à 100° C en présence de SDS. Sans chauffage la protéine sous forme native présente une structure en feuillets  $\beta$  qui fixe plus de SDS et migre donc plus loin vers l'anode que la forme dénaturée (dénaturation complète après 5 min. à 100 ° C) qui présente une structure en hélices  $\alpha$  (KELLER, K. B. 1978, J. Bacteriol., 134, 1181-1183).

La contamination par les lipopolysaccharides (LPS) est estimée par dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide  $\beta$ -hydroxymyristique, acide gras marqueur des LPS de *Klebsiella pneumoniae* (tableau 1).

Cette méthode ne peut être utilisée que pour approcher la teneur en LPS des échantillons issus des différentes étapes de purification.

La quantité d'acide  $\beta$ -hydroxymyristique présente dans la fraction P40 après chromatographie d'échange de cations étant inférieure au seuil de quantification du dosage, on peut estimer que la quantité de LPS résiduel est inférieure à 1%.

## Exemple 2 : Clonage et expression de la protéine P40

### Matériel et méthode

#### Souches bactériennes

\* *E. coli* : RV 308 : souche ATCC 31608 (Maurer, R. et al., 1980, J. Mol. Biol., 139, 147-161).

\* *K. pneumoniae* : IP 145 : souche C.I.B.P.F - Brevet d'invention déposé le 19 janvier 1981.

## V cteurs

\* pRIT 28 (Hultman T. et al., 1988, Nucléosides Nucléotides, 7 : 629-638) : vecteur de clonage et de séquençage possédant le gène de résistance à l'ampicilline, les origines de réplique d'E. coli et du phage F1 ainsi qu'une portion du gène lac-Z d'E. coli ( $\beta$ -galactosidase).

\* pVABB : vecteur d'expression de fusion de gène.

## Solutions

### \* Amplification génique

Tampon de lyse : 25 mM Taps pH 9,3  
2 mM  $MgCl_2$

Tampon d'amplification : 25 mM Taps pH 9,3  
2 mM  $MgCl_2$   
Tween 20 0,1 %  
200 mM dNTP.

### \* Purification des protéines

TST (20X) : Tris base 0,5 M  
HCl 0,3 M  
NaCl 4 M  
Tween 20 1%  
EDTA 20 mM

Tampon de lavage : Tris HCl 50 mM pH 8,5  
 $MgCl_2$  5 mM

Solution de dénaturation : Gua-HCl 7,8 M  
Tris-HCl 28 mM pH 8,5

Solution de renaturation :	Gua-HCl	0,5 M	pH 8,5
	Tris-HCl	25 mM	
	NaCl	150 mM	
	Tween 20	0,05 %	

5

### Synthèse des oligonucléotides

10 Les amorces nucléotidiques ont été déterminées à partir de la partie de la séquence publiée de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* (Lawrence, J.G. et al., 1991, J. Gen. Microbiol., 137: 1911-1921) de la séquence consensus issue de l'alignement des séquences de 5 OMPA d'entérobactéries (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *S. dysenteriae*, *E. aerogenos*), ainsi que des séquences de peptides obtenus par séquençage manuel.

15 Les oligonucléotides ont été synthétisés selon la méthode chimique des phosphoramidites sur l'appareil "Gene Assembler Plus" de Pharmacia.

### Amplification génique par PCR du gène P40

20 L'ADN de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* a été amplifié de la manière suivante.

Une colonie de *Klebsiella pneumoniae* est lysée dans 10 µl de tampon de lyse par chauffage à 95° C pendant 5 minutes.

25 1 µl de cette solution sert de source d'ADN pour les réactions d'amplification.

Celles-ci sont réalisées dans 100 µl de tampon d'amplification, avec 5 pmoles de chaque amorce et une unité d'enzyme Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30 secondes à 95° C suivie d'une hybridation de l'amorce à l'ADN et d'une extension d'une minute à 72° C. 30 cycles sont ainsi effectués à l'aide d'un thermocycleur "Gen Amp PCR" 9000 Perkin Elmer Cetus.

30

Les PCR suivantes sont réalisées à partir des fragments d'ADN amplifiés précédemment.

Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite digérés et liés au vecteur pRIT 28.

5

### Séquençage

Les fragments ainsi clonés sont séquencés sur un séquenceur automatique 373 DNA Séquenceur d'Applied Biosystem. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit "dye Terminator" selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystem) soit sur de l'ADN double brin obtenu après amplification génique ou issu de maxiprep soit sur de l'ADN simple brin issu de fragments PCR dénaturés (Hultman, T. et al, 1989, Nucleid Acids Rev. 17 : 4937-4946).

15

### Expression de la protéine

Le gène entier de P40 est cloné dans le vecteur d'expression pVABB. Ce vecteur permet d'adjoindre une queue d'affinité "BB" à P40 ; B étant la partie de la protéine G du streptocoque qui lie la serumalbumine (Nygren, P.A. et al, 1988, J. Mol. Recognit. 1, 69-74).

20

Les souches d'E. coli RV308 transformées par le vecteur pVABBP40 sont mises à cultiver une nuit à 37° C sous agitation, dans 100 ml de TSB complémenté en extrait de levure, en ampicilline (200 µg/ml) en tétracycline (8 µg/ml) et en tryptophane (100 µg/ml). Le lendemain, une culture à D0 = 1 pour une longueur d'onde de 580 nm est préparée dans du TSB + extraits de levure + ampi + tetra.

25

Après 10 minutes de culture, l'expression de la protéine est induite par addition d'IAA à (25 µg/ml) dans le milieu. La culture est centrifugée à 4° C à 2460 g pendant 10 minutes.

30

Le culot est repris par 20 ml de TST 1 x pH 7,4, et la solution est alors centrifugée à 4° C à 23000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose ce qui permet d'isoler les protéines dites solubles. Le culot est lavé avec du tampon de lavage puis centrifugé à 23000 g à 4° C pendant 30 minutes. Le culot renfermant les corps d'inclusion est alors repris par 900 µl d'une solution dénaturante + 100 µl de Dithiothreitol 10 mM et incubé 2 heures à 37° C.

La solution est ensuite incubée 1 nuit à température ambiante, sous agitation, dans 100 ml de tampon de renaturation puis centrifugée à 23 000 g à 4°C pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose.

Dans les deux cas les protéines fixées sont éluées avec de l'acide acétique 0,5 M pH 2,8 et collectées par fraction de 1 ml.

Les fractions collectées sont ensuite analysées sur gel d'électrophorèse en SDS-PAGE et par Immuno blot.

## Résultats

Le clonage du gène a été effectué en trois temps selon la stratégie présentée sur la figure 1.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la partie de la séquence publiée à l'exception d'un T à la place d'un A en position 103.

Puis nous avons déterminé la séquence en 3' du gène et enfin celle en 5'.

Le gène entier a été obtenu par fusion des deux parties 8/4 et 3/14 puis cloné dans le vecteur pRIT 28. La séquence est la séquence id n° 1.

La protéine est exprimée sous la forme BBP40.

Elle est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. Pour une culture de 200 ml, on purifie une quinzaine de milligrammes de protéine.

Le profil électrophorétique montre que BBP40, obtenue après dénaturation, est d'une grande pureté. Le poids moléculaire apparent, correspond au poids théorique calculé qui est de 63 kDa.

La caractérisation en Immuno blot montre que la protéine purifiée est bien reconnue par un sérum de lapin anti-P40.

### Exemple 3 : Protéine de fusion BBP40G2ΔC, sous groupe a

Un oligonucléotide correspondant à la partie N Terminale délétée du codon stop du gène, a été synthétisé.

La partie en 5' a été amplifiée par PCR, purifiée, clonée dans le vecteur pRIT 28 et séquencée, selon la méthodologie décrite dans l'exemple 2.

Dans un deuxième temps, les deux parties du gène ont été fusionnées et clonées dans le vecteur pVABBG2ΔC (figure n° 2). G2ΔC représente la séquence d'un fragment de 101 amino-acides de la protéine G du virus respiratoire syncytial G (130-230).

Des bactéries E. coli de la souche RV308 sont ensuite transformées avec le vecteur PVABBG2ΔC.

Les protéines produites sont purifiées comme déjà décrit pour BBP40.

## Résultats

La protéine BBP40G2ΔC est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. On purifie une douzaine de mg de protéines à partir de 200 ml de milieu de culture.

En électrophorèse, la protéine est assez pure.

La masse moléculaire apparente correspond à la masse théorique calculée qui est de 75 kDa.

### Exemple 4 : Clonage et expression de trois fragments de P40

## Matériel et méthodes

## Les oligonucléotides

Trois oligonucléotides complémentaires de la séquence de P40 ont été synthétisés : 16-17-18 (cf. figure 3).

5 Des parties du gène déterminées ont ensuite été amplifiées en PCR à partir de l'ADN d'une miniprep (protocole Applied) de pRIT 28 P40.

On a ainsi pu cloner la partie du gène correspondant à la totalité de la partie transmembranaire (8/17, baptisé fragment n° 8) à deux boucles externes-deux portions transmembranaires (16/17, baptisé fragment n°16) et 1 boucle externe deux portions transmembranaires (18/17, baptisé fragment n° 18).

Les fragments d'ADN ainsi amplifiés sont digérés puis isolés et ligués au vecteur pRIT 28 et séquencés (cf. BBP40 clonage de P40).

## 15 La protéine de fusion BBAP40G2AC

Le gène G2AC est digéré à partir du vecteur pRIT 28 G2AC puis ligué au vecteur digéré pRIT 28  $\Delta$ P40 ( $\Delta$ P40 représente un des fragments de P40).

20 Ensuite, l'ensemble  $\Delta$ P40G2AC est digéré et cloné dans pVABB (cf. figure 4).

Les trois protéines hybrides sont exprimées selon le protocole décrit pour BBP40.

## Résultats

25

Tout comme BBP40 et BBP40G2AC, BB8G2AC est obtenu essentiellement à partir des corps d'inclusion. Une culture de 400 ml donne une dizaine de mg de protéines.

30 Par contre, les protéines BB18G2AC, et BB16G2AC se retrouvent majoritairement à l'étape de sonication, sous forme soluble. Dans les deux cas, on obtient une dizaine de mg/400 ml de culture.

Ces protéines ont été caractérisées en électrophorèse SDS-PAGE. Leur masse moléculaire correspond à la masse théorique calculée :

BB8G2ΔC 58,03 kDa

BB16G2ΔC 46,5 kDa

5 BB18G2ΔC 45,5 kDa

Les trois hybrides sont reconnus aussi bien par un anticorps polyclonal anti- G2 qu'anti P40 en Western Blot.

### Exemple 5

10

#### 1. Effets de la protéine P40 sur des cellules du système immunitaire

##### 1.a. Lymphocytes B

15

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) aux jours 0 et 21, 30 µg de P40 obtenus par extraction de la membrane (P40 ext) ou par recombinaison génétique (P40 rec, c'est-à-dire BBP40). Les immunisations ont été effectuées sans aucun adjuvant. 10 jours après la dernière immunisation, la réponse en anticorps anti-P40ext a été évaluée sur les sérums individuels par la méthode ELISA. Le tableau 2 donne la moyenne des titres obtenus sur 5 échantillons. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-P40ext.

25 Tableau 2 : réponse anticorps anti-P40ext

30

Immunisations avec:	xtP40	recP40
Titres d'anticorps :	87040	112640



Dans ces conditions expérimentales, la P40rec est aussi immunogène que la P40ext. Ces deux protéines contiennent donc des épitopes B qui interagissent avec les lymphocytes B.

## 5 1.b. Lymphocytes T

La réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) à la P40ext a été mesurée par le test du gonflement différé du coussinet. Des souris BALB/c (5 par groupe) ont été sensibilisées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext sans le moindre adjuvant. Après 6 à 10 jours, les souris ont été stimulées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext/20 µl dans le coussinet postérieur droit, alors que le coussinet postérieur gauche recevait du PBS. 24 heures plus tard, le gonflement du coussinet a été mesuré. On n'observe pas d'hypersensibilité retardée dans le contrôle négatif (5 souris non sensibilisées).

Tableau 3 : réaction d'hypersensibilité retardée induite par P40ext, mesurée par le gonflement du coussinet (en mm)

J6		J10	
BALB/c	C57B1/6	BALB/c	C57B1/6
7,9	7,8	7,5	7,4

Les résultats montrés dans le tableau 3 indiquent que les souris immunisées avec P40ext produisent des réactions d'hypersensibilité retardée hautement quantitatives dans le coussinet. La réaction HSR reflète la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nécessitant des cellules Th1. On peut en conclure que P40 ext contient au moins un épitope T qui est capable de favoriser la réponse Th1, sans restriction MHC.

### 1.3. Macrophages

L'effet de P40ext sur des macrophages a été déterminé par leur production de nitrite. Des cellules RAW 264,7, qui sont des monocytes-macrophages de souris, ont été incubées 72 heures à 37° C en présence de différentes concentrations de P40ext. La quantité de nitrites dans le surnageant des cultures cellulaires a été mesurée par un dosage colorimétrique avec le réactif de Griess-Ilosvay.

La production de nitrite reflète l'activation des macrophages, et joue un rôle crucial dans l'activité anti-microbienne et anti-tumorale de ces cellules. Les données obtenues montrent que P40ext stimule la production de nitrite des cellules RAW 264,7, démontrant que P40ext active les macrophages.

## 2. P40 est un porteur à effet adjuvant pour un peptide (G1ΔC)

### 2.1. Comparaison de P40ext avec d'autres supports

Le peptide utilisé est G1ΔC, un peptide obtenu à partir de la protéine G du RSV : (G174-187 ΔC) Trudel et al., 1991, J. Virol. 185 : 749-757.

### Cinétique de la réponse immunitaire contre G1 ΔC

Des souris C57Bl/6 (5 par groupe) sont immunisées avec G1 ΔC sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1 ΔC sont comparées dans le temps : 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

La réponse anti-G1 ΔC est significativement plus élevée et plus rapide lorsque les souris sont immunisées avec P40/G1 ΔC que les immunisations plus classiques TT/G1 ΔC et KLH/G1 ΔC+AF. Une seule injection de P40/G1 ΔC permet d'obtenir, en 7 jours, un titre d'anticorps anti-G1 ΔC de 1000. Ce titre est obtenu avec TT/G1 ΔC+AF en 28 jours. La réponse maximum (titre = 1/380000), obtenue après trois injections, en 28

jours, est environ 30 fois supérieure à celle obtenue avec KLH/G1  $\Delta$ C +AF et 70 fois supérieure à celle obtenue avec TT/G1  $\Delta$ C. Le titre en anticorps anti-G1 se maintient sans faiblir jusqu'au jour 42.

## 5 Conclusion

Le couplage chimique du peptide G1  $\Delta$ C sur la protéine P40 a permis d'induire une réponse anti-G1  $\Delta$ C aussi importante que les modèles de référence KLH/G1  $\Delta$ C+AF ou TT/G1  $\Delta$ C.

10 Les résultats obtenus montrent que P40ext est une molécule porteuse à effet adjuvant pour G1 $\Delta$ C : P40ext est meilleure que la toxine tétanique et aussi bonne que l'association KLH + adjuvant de Freund.

### 2.1. Distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C

15

Les isotypes des sérums obtenus pendant les expériences décrites ci-dessus ont été déterminés par ELISA. Le tableau 4 présente la moyenne des valeurs de A450 de 5 sérums individuels testés à la dilution 1/250.

20 **Tableau 4 : distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C**

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
25 A450 (dil.1/250)	2,892	1,212	2,970	0,209

30 On a montré que la sécrétion d'isotype d'anticorps est régulée par des sous-ensembles de cellules Th spécifiques d'un antigène qui peuvent être divisés en deux sous-ensembles Th1 et Th2. Les clones Th1 produisent de l'IL-2 et IFN-gamma, et des lymphotoxines, alors que les clones Th2 produisent

de l'I $\Pi$ -4 et de l'I $\Pi$ -5. Les clones de Th1 et de Th2 induisent spécifiquement la sécrétion par les cellules B spécifiques d'un antigène, respectivement d'IgG2a + IgG3 et d'IgG1 + IgG2b + IgE. Les données présentées dans le tableau 4 montrent que IgG1 et IgG2b sont les deux isotypes majeurs des anticorps anti G1 $\Delta$ C, l'IgG2a étant également représenté. On peut en conclure que chez les souris C57B1/6, P40-G1 $\Delta$ C provoque une réponse Th2 supérieure à la réponse Th1.

## 2.2. Etude dose-effet

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) différentes concentrations de P40ext-G1 $\Delta$ C, aux jours 0, 10 et 21. Une semaine après la dernière immunisation, des échantillons de sang sont prélevés et la réponse anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C est estimée sur les sérums individuels par ELISA. La moyenne des titres de 5 échantillons est effectuée.

La figure 5 montre le rapport dose-effet de P40ext-G1 $\Delta$ C. Une réponse anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C est obtenue avec 1  $\mu$ g de P40ext-G1 $\Delta$ C. Les titres en anticorps les plus élevés sont observés avec 10 à 50  $\mu$ g de P40ext-G1 $\Delta$ C.

## 2.4. Détermination du schéma d'immunisation optimale

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) P40ext-G1 $\Delta$ C (équivalent à 10  $\mu$ g de G1  $\Delta$ C) aux jours indiqués sur la figure 6. La réponse anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C est déterminée sur les sérums individuels par ELISA. 4 schémas d'immunisations ont été testés : une injection, deux injections aux jours 0 et 14, ou aux jours 0 et 21, et trois injections aux jours 0, 21 et 40. La réponse anticorps anti-peptide anti-G1 $\Delta$ C la plus élevée est obtenue avec trois injections.

### 3. P40ext est un adjuvant efficace pour un antigène protéique (BBG2ΔC)

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) BBG2ΔC conjugué chimiquement à P40ext (équivalent à 10 μg de G2 ΔC) aux jours 0 et 21. Dix jours plus tard, la réponse anticorps anti-G2 ΔC est déterminée dans les sérums individuels par ELISA. Les moyennes des titres de 5 échantillons sont données dans le tableau 5. Le contrôle négatif ne contenait pas d'anticorps anti-G2ΔC.

Tableau 5 : effet adjuvant de P40ext sur un antigène protéique

	Titre en anticorps anti-G2ΔC
BBG2ΔC	160
BBG2ΔC + adjuvant de Freund	2051200
extP40-BBG2ΔC	29800

BBG2ΔC est faiblement immunogène. L'utilisation d'adjuvant de Freund augmente le titre en anticorps anti-G2ΔC. Quand BBG2ΔC est conjugué par voie chimique à P40ext, la réponse anticorps anti-G2ΔC est augmentée d'environ 200 fois. P40ext est donc un bon adjuvant pour un antigène protéique.

### 4. Activité adjuvante des fragments de P40

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) au jour 0 et stimulé au jour 21 par les protéines recombinantes suivantes : BBG2ΔC avec ou sans adjuvant de Freund (AF), la protéine de fusion BBP40G2ΔC, la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 8 (BB8G2ΔC), la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 16 (BB16G2ΔC) et la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 18 (BB18G2ΔC) ( 10 μg équivalent G2 ΔC).

Au jour 31, les réponses anticorps anti-G2ΔC et anti-P40 sont déterminées par ELISA dans les sérums individuels. La moyenne des titres de 5 sérums individuels est effectuée. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-G2ΔC.

5

**Tableau 6 : effet adjuvant des fragments recombinants de P40**

10

	Titre en anticorps anti-G2ΔC	Titre en anticorps anti-P40
BBG2ΔC	200	-
BBG2ΔC + AF	163 840	-
BBP40G2ΔC	56 320	266 240
BB8G2ΔC	112 640	33 280
BB16G2ΔC	6 480	180
BB18G2ΔC	17 280	2 800

15

20

Dans cette expérience, on montre que les fragments de P40 choisis supportent les propriétés adjuvantes de la protéine entière, surtout les fragments n° 8 et n° 18. La réponse anticorps anti-P40 est considérablement réduite en utilisant les fragments de P40.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1008 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCT	CCG	AAA	GAT	AAC	ACC	TGG	TAT	GCA	GGT	GGT	AAA	CTG	GGT	TGG	TCC	48
Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	
1				5					10					15		
CAG	TAT	CAC	GAC	ACC	GGT	TTC	TAC	GGT	AAC	GGT	TTC	CAG	AAC	AAC	AAC	96
Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	
			20					25					30			
GGT	CCG	ACC	CGT	AAC	GAT	CAG	CTT	GGT	GCT	GGT	GCG	TTC	GGT	GGT	TAC	144
Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	
		35					40					45				
CAG	GTT	AAC	CCG	TAC	CTC	GGT	TTC	GAA	ATG	GGT	TAT	GAC	TGG	CTG	GGC	192
Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	
	50					55					60					
CGT	ATG	GCA	TAT	AAA	GGC	AGC	GTT	GAC	AAC	GGT	GCT	TTC	AAA	GCT	CAG	240
Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	
65					70					75					80	
GGC	GTT	CAG	CTG	ACC	GCT	AAA	CTG	GGT	TAC	CCG	ATC	ACT	GAC	GAT	CTG	288
Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	
				85				90						95		
GAC	ATC	TAC	ACC	CGT	CTG	GGC	GGC	ATG	GTT	TGG	CGC	GCT	GAC	TCC	AAA	336
Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	
			100					105					110			
GGC	AAC	TAC	GCT	TCT	ACC	GGC	GTT	TCC	CGT	AGC	GAA	CAC	GAC	ACT	GGC	384
Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	
			115				120					125				

GTT	TCC	CCA	GTA	TTT	GCT	GGC	GGC	GTA	GAG	TGG	GCT	GTT	ACT	CGT	GAC	432
Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	
130						135					140					
ATC	GCT	ACC	CGT	CTG	GAA	TAC	CAG	TGG	GTT	AAC	AAC	ATC	GGC	GAC	GCG	480
Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	
145					150					155					160	
GGC	ACT	GTG	GGT	ACC	CGT	CCT	GAT	AAC	GGC	ATG	CTG	AGC	CTG	GGC	GTT	528
Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	
				165					170					175		
TCC	TAC	CGC	TTC	GGT	CAG	GAA	GAT	GCT	GCA	CCG	GTT	GTT	GCT	CCG	GCT	576
Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu	Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	
			180					185					190			
CCG	GCT	CCG	GCT	CCG	GAA	GTG	GCT	ACC	AAG	CAC	TTC	ACC	CTG	AAG	TCT	624
Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	
			195				200					205				
GAC	GTT	CTG	TTC	AAC	TTC	AAC	AAA	GCT	ACC	CTG	AAA	CCG	GAA	GGT	CAG	672
Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	
	210					215					220					
CAG	GCT	CTG	GAT	CAG	CTG	TAC	ACT	CAG	CTG	AGC	AAC	ATG	GAT	CCG	AAA	720
Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	
225					230					235					240	
GAC	GGT	TCC	GCT	GTT	GTT	CTG	GGC	TAC	ACC	GAC	CGC	ATC	GGT	TCC	GAA	768
Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	
				245				250						255		
GCT	TAC	AAC	CAG	CAG	CTG	TCT	GAG	AAA	CGT	GCT	CAG	TCC	GTT	GTT	GAC	816
Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	
			260					265					270			
TAC	CTG	GTT	GCT	AAA	GGC	ATC	CCG	GCT	GGC	AAA	ATC	TCC	GCT	CGC	GGC	864
Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	
		275					280					285				
ATG	GGT	GAA	TCC	AAC	CCG	GTT	ACT	GGC	AAC	ACC	TGT	GAC	AAC	GTG	AAA	912
Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	
	290					295					300					
GCT	CGC	GCT	GCC	CTG	ATC	GAT	TGC	CTG	GCT	CCG	GAT	CGT	CGT	GTA	GAG	960
Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	
305					310					315					320	
ATC	GAA	GTT	AAA	GGC	TAC	AAA	GAA	GTT	GTA	ACT	CAG	CCG	GCG	GGT	TAA	1008
Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys	Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Gly		
				325					330					335		



(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln  
210 215 220

Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys  
 225 230 235 240

Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu  
 245 250 255

Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp  
 260 265 270

Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly  
 275 280 285

Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys  
 290 295 300

Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu  
 305 310 315 320

Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly  
 325 330 335

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 537 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCT	CCG	AAA	GAT	AAC	ACC	TGG	TAT	GCA	GGT	GGT	AAA	CTG	GGT	TGG	TCC	48
Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	
1				5					10					15		
CAG	TAT	CAC	GAC	ACC	GGT	TTC	TAC	GGT	AAC	GGT	TTC	CAG	AAC	AAC	AAC	96
Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	
			20					25					30			
GGT	CCG	ACC	CGT	AAC	GAT	CAG	CTT	GGT	GCT	GGT	GCG	TTC	GGT	GGT	TAC	144
Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	
		35				40						45				
CAG	GTT	AAC	CCG	TAC	CTC	GGT	TTC	GAA	ATG	GGT	TAT	GAC	TGG	CTG	GGC	192
Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	
	50					55					60					
CGT	ATG	GCA	TAT	AAA	GGC	AGC	GTT	GAC	AAC	GGT	GCT	TTC	AAA	GCT	CAG	240
Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	
65					70					75					80	

GGC	GTT	CAG	CTG	ACC	GCT	AAA	CTG	GGT	TAC	CCG	ATC	ACT	GAC	GAT	CTG	288
Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	
				85					90					95		
GAC	ATC	TAC	ACC	CGT	CTG	GGC	GGC	ATG	GTT	TGG	CGC	GCT	GAC	TCC	AAA	336
Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	
			100					105					110			
GGC	AAC	TAC	GCT	TCT	ACC	GGC	GTT	TCC	CGT	AGC	GAA	CAC	GAC	ACT	GGC	384
Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	
		115					120					125				
GTT	TCC	CCA	GTA	TTT	GCT	GGC	GGC	GTA	GAG	TGG	GCT	GTT	ACT	CGT	GAC	432
Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	
	130					135				140						
ATC	GCT	ACC	CGT	CTG	GAA	TAC	CAG	TGG	GTT	AAC	AAC	ATC	GGC	GAC	GCG	480
Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	
145					150					155					160	
GGC	ACT	GTG	GGT	ACC	CGT	CCT	GAT	AAC	GGC	ATG	CTG	AGC	CTG	GGC	GTT	528
Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	
				165					170					175		
TCC	TAC	CGC														537
Ser	Tyr	Arg														

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 179 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	
1				5					10					15		
Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	
		20						25					30			
Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	
		35					40					45				
Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	
	50					55					60					
Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	
65					70					75					80	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(A) LONGUEUR: 216 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

BNSDOCID: <FR\_2726472A1\_I>

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

```

Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser
 1           5           10           15

Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp
          20           25           30

Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn
          35           40           45

Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met
          50           55           60

Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg
          65           70

```

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 159 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

```

ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT 48
Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr
 1           5           10           15

CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC 96
Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly
          20           25           30

GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG 144
Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu
          35           40           45

GGC GTT TCC TAC CGC 159
Gly Val Ser Tyr Arg
          50

```

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 53 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr  
1 5 10 15

Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly  
20 25 30

Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu  
35 40 45

Gly Val Ser Tyr Arg  
50

**REVENDEICATIONS**

1. Produit adjuvant destiné à améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins  
5 une partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*.

2. Produit adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine présentant la séquence ID n° 2 ou présentant au  
10 moins 80% d'homologie avec cette séquence.

3. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*, ou une séquence présentant au moins  
15 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

4. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au  
20 moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

5. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence  
25 présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

6. Protéine ou peptide présentant l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 ou ID n° 8.

7. Séquence d'ADN codant pour un produit selon l'une des revendications 1 à 6.

30 8. Complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et l'adjuvant comprend un produit selon l'une des revendications 1 à 6.

35

9. Complexe immunogène selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'élément immunogène est associé à l'adjuvant par une liaison covalente.

5 10. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'élément immunogène est constitué d'un fragment de la protéine G du RSV.

10 11. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que l'élément immunogène, associé à l'adjuvant, est fusionné avec une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

12. Procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à un adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, sous forme d'un complexe selon l'une des revendications 8 à 11.

15 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on associe l'antigène ou l'haptène à l'adjuvant par couplage chimique.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que l'antigène ou l'haptène est fusionné par génie génétique à l'adjuvant.

20 15. Vaccin caractérisé en ce qu'il contient un complexe selon l'une des revendications 8 à 11, susceptible d'être préparé par le procédé selon l'une des revendications 12 à 14.

16. A titre de médicament, séquence d'ADN selon la revendication 7.

25 17. Utilisation d'une séquence d'ADN selon la revendication 7 pour la préparation d'un vaccin utile par voie intramusculaire ou intradermale.

18. Procédé de préparation d'un produit adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

30 a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,

b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,



- c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- 5 e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

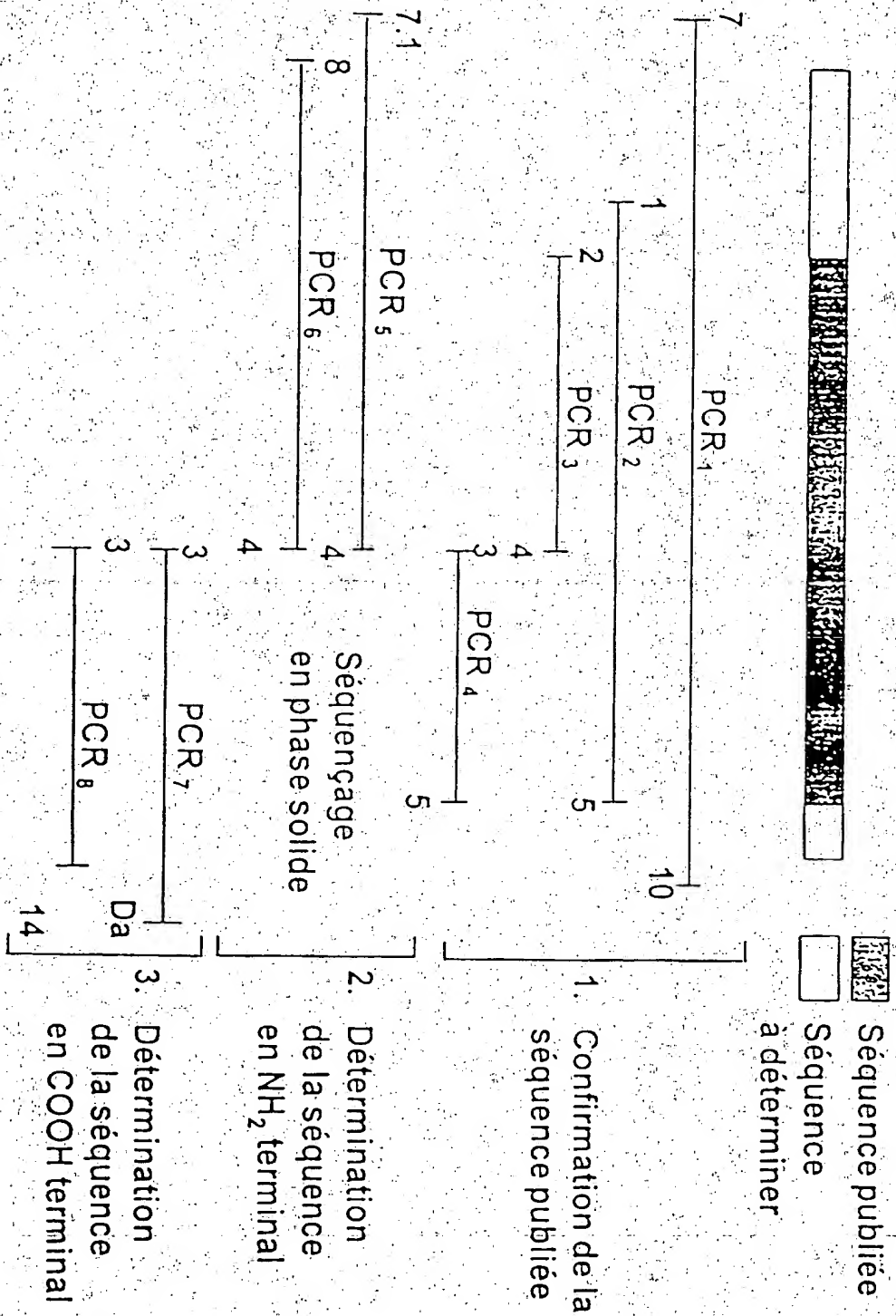


Figure 1

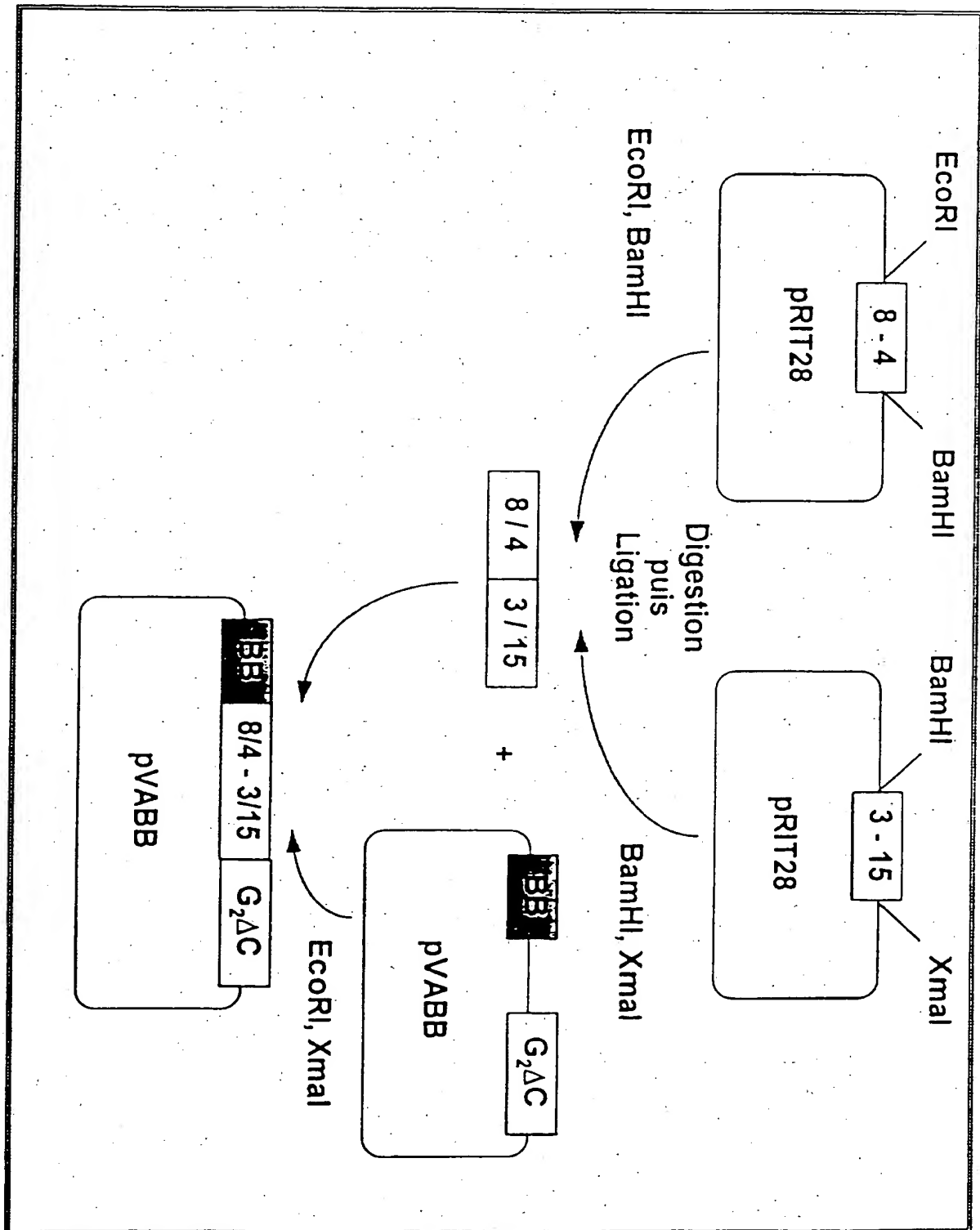


Figure 2

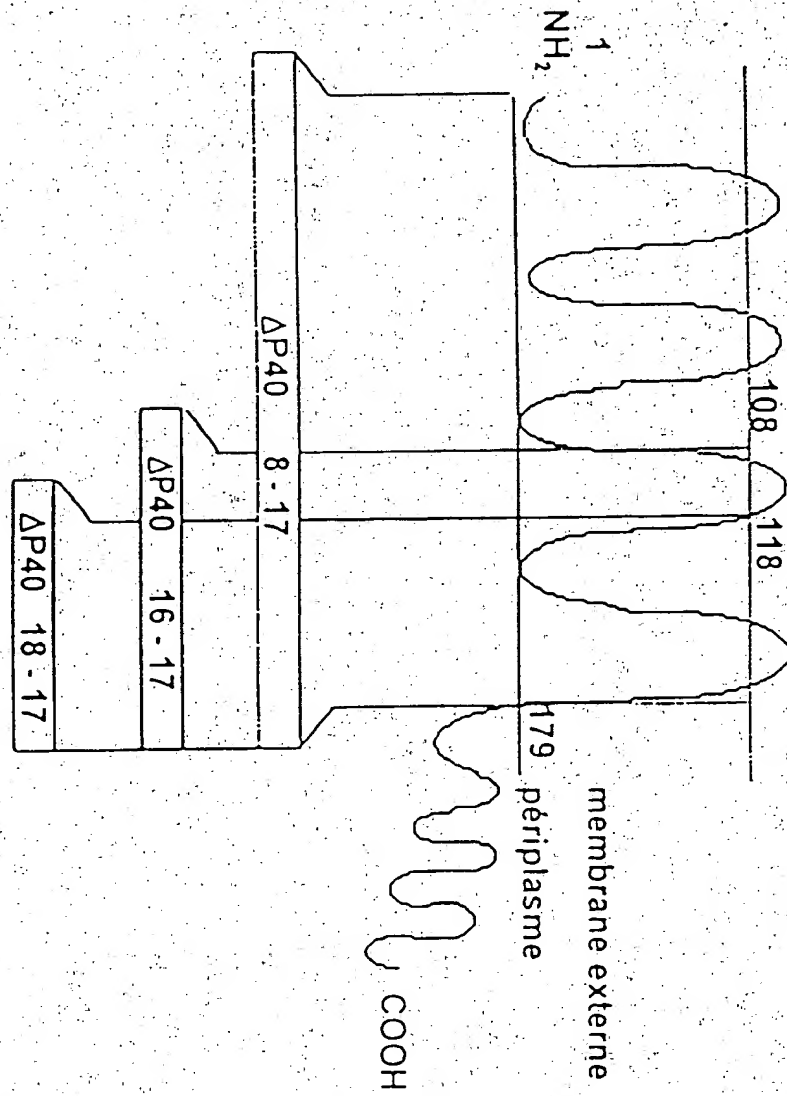


Figure 3

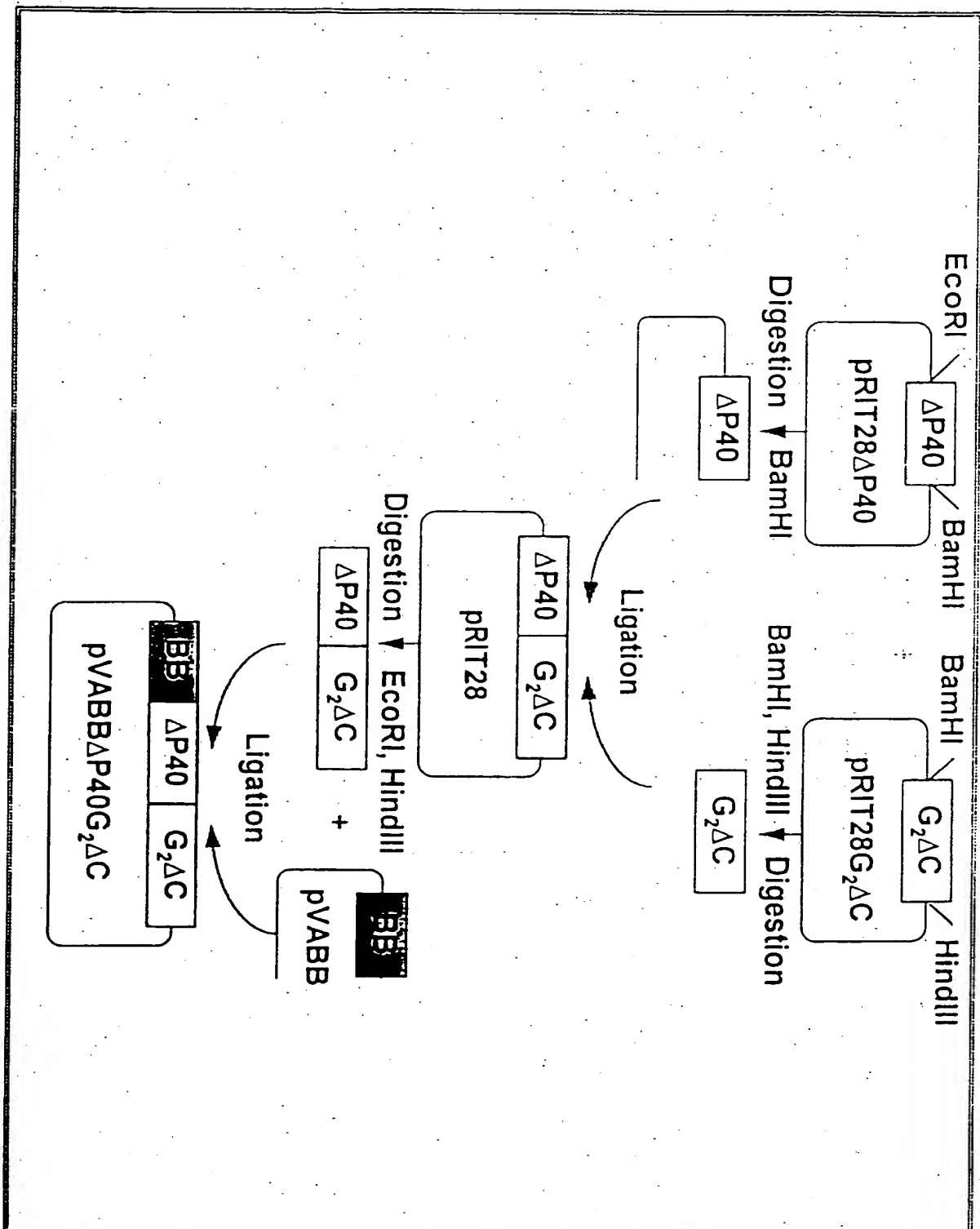


Figure 4

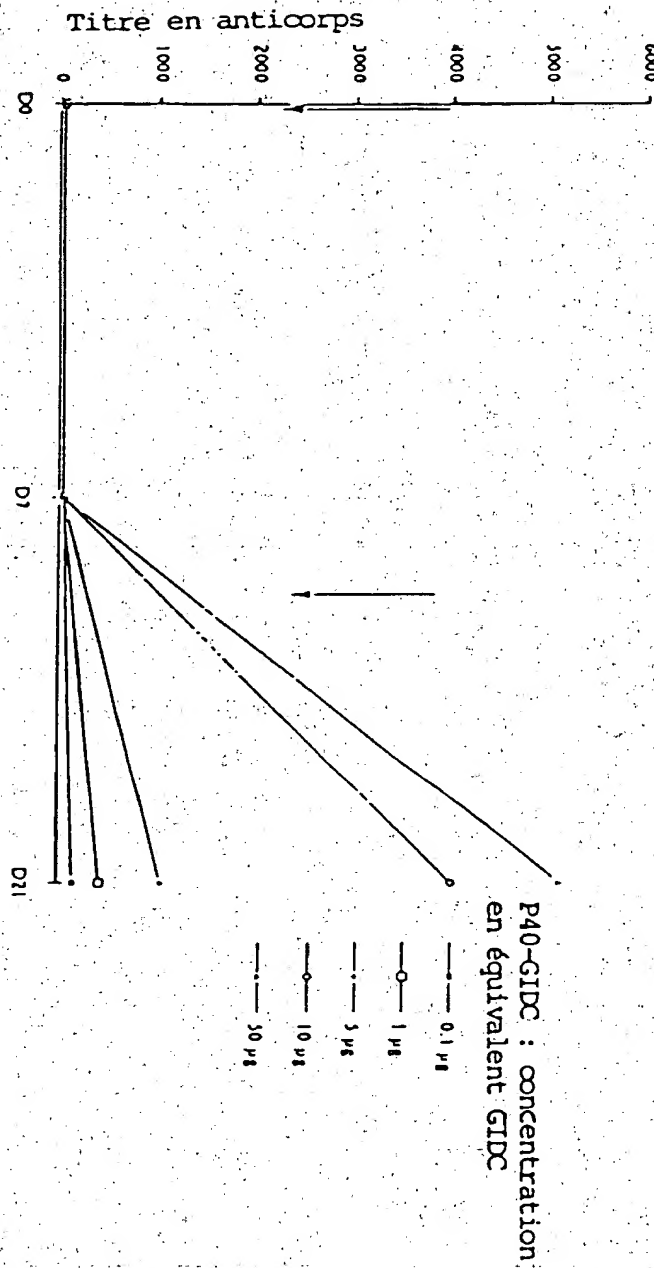


Figure 5

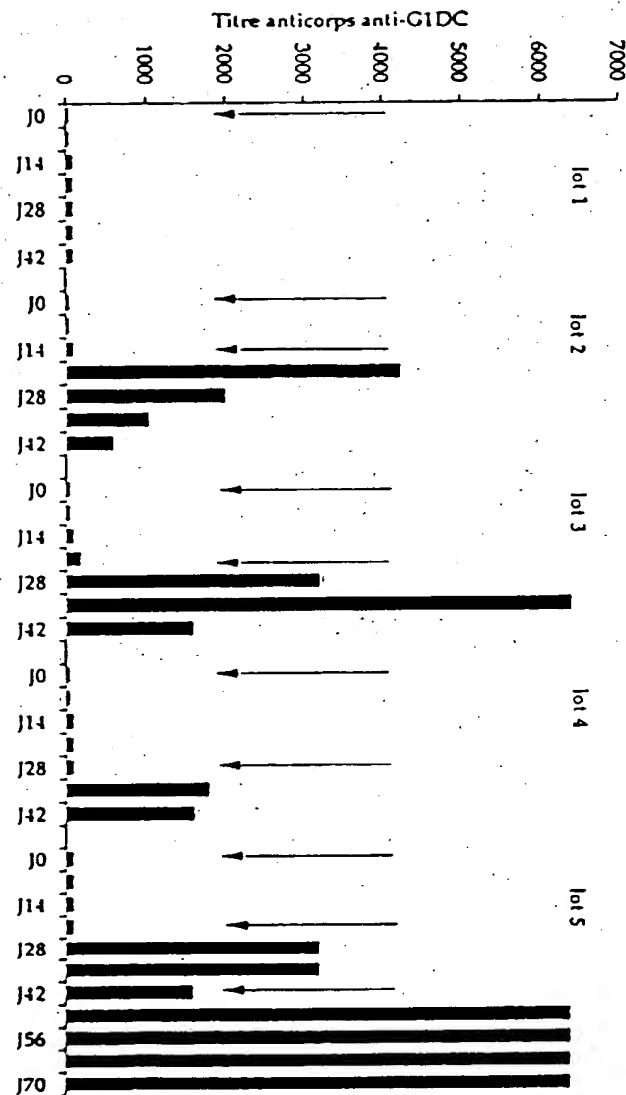


Figure 6

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, Août 1991 pages 1911-1921, LAWRENCE J.G. ET AL. 'Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria'	7
Y	* le document en entier * ---	1,8-15
Y	WO-A-89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) * le document en entier * -----	1,8-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
12 Juillet 1995		Moreau, J
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		